拟除虫菊酯对家蝇 Na-K-ATPase 抑制作用的研究*

何运转** 李 梅 冯国蕾 王荫长**

（中国科学院动物研究所，北京 100080）

摘要 通过对家蝇神经系统 Na-K-ATPase 性质的研究，表明 Na-K-ATPase 反应的适宜 pH 值为 7.0～8.0，适温为 35～40℃，K_m 为 0.22 mmol/L，V_{max} 为 555.56 nmol /(mg•min)。比较测定了家蝇敏感品系、Del-R、2Cl-R 抗性品系的 Na-K-ATPase 活性及溴氰菊酯和氯菊酯对该酶的抑制作用。实验证明，敏感与抗性品系间 Na-K-ATPase 活力无显著的差异，但溴氰菊酯和氯菊酯对不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的抑制作用有明显区别，两种拟除虫菊酯可抑制敏感家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性，而对抗性品系无明显的抑制作用。

关键词 Na-K-ATPase，家蝇，拟除虫菊酯

Na-K-ATPase 广泛分布于各类细胞质膜上，在可兴奋细胞如神经突触质膜上含量尤为丰富[1]。Na-K-ATPase 的基本功能是催化 ATP 末端磷酸水解，并利用该反应产生的自由能来逆电化学梯度，进行 Na^+、K^+ 的主动运输，从而维持细胞膜内外 Na^+、K^+ 离子浓度的相对恒定及渗透压的平衡，以保证细胞正常的神经传导或物质吸收等重要的生理功能[2,3]。近代杀虫剂分子毒理学研究发现，拟除虫菊酯类杀虫剂的毒理机制与昆虫神经系统中 Na-K-ATPase 有着密切的关系[4]，而对 Na-K-ATPase 与抗性间的关系，目前研究的甚少。为此，本文采用冯北元介绍的 Na-K-ATPase 活力的微量测定方法[5]，以敏感家蝇品系为试材，研究其神经系统中 Na-K-ATPase 活力测定的最佳反应条件，在此条件下，测定了溴氰菊酯和氯菊酯对不同家蝇品系神经系统中 Na-K-ATPase 的抑制作用，以明确家蝇 Na-K-ATPase 与拟除虫菊酯抗性的关系，为延长拟除虫菊酯类农药的使用寿命，延缓抗性的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫：家蝇敏感品系（SP）：引自美国 Texas A&M 大学昆虫系 Plapp 教授实验室，未接触过任何杀虫剂；抗氯菊酯品系（2Cl-R）：1979 年由“南口”种群选育的，室内用氯菊酯连续汰选；抗溴氰菊酯品系（Del-R）：1983 年采自养鸭场，在室内用溴氰菊酯进行筛选培育。

---

* 国家自然科学基金资助项目
** 南京农业大学植保系，210095
1997-09-16 收稿，1998-01-06 收修改稿

杀虫剂及试剂：氯菊酯（Permethrin）为上海联合化工厂产品，纯度为90%；溴氰菊酯（Deltamethrin）为法国罗素•优克福公司产品，纯度为99%；PP'-DDT，纯品。

ATP钠盐，德国；Ouabain：Fluka产品；Ficoll：Pharmacia产品；考马斯亮兰：Fluka产品；其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 生物测定：将羽化后4～5天的成虫，用乙醚麻醉，选取雌虫用点滴法测定。杀虫剂用丙酮稀释成系列浓度，然后用微量点滴器醮取药液，点于家蝇的背板上，24 h后检查死虫数，计算 LD_{50} 及95%置信限。

1.2.2 酶源制备：参照Feng的方法[6]，略有改进。将羽化后4～5天的家蝇取出，于－20℃低温冰柜中冷冻1 h，过筛，取头部称重，加入10倍体积含0.1 mol/L Tris、1 mmol/L EDTA、0.25 mol/L蔗糖缓冲液（pH＝7.4），研磨、匀浆，3 000 r/min离心10 min，取上清液，在13 000 r/min条件下，离心30 min，取沉淀，用6 mL 0.25 mol/L蔗糖缓冲液悬浮，在25 000 r/min、18%和4%（1∶1）的Ficoll蔗糖溶液中梯度离心60 min，取出4%、18%界面间的悬浮物，按1∶3比例加入10 mmol/L Tris-HCl（pH＝7.4）缓冲液，15 000 r/min离心20 min，沉淀物用10 mmol/L Tris-HCl（pH＝7.4）缓冲液悬浮并稀释至所需浓度，作为酶源。所有操作均在4℃的条件下进行。

1.2.3 Na-K-ATPase活力的测定：参照冯北元方法进行[5]。反应体积为100 μL，分3组，每组反应体系中均含有50 mmol/L Tris-HCl、含6～10 μg蛋白质的酶液、5 mmol/L $MgCl_2$，3组不同之处为：I组含有150 mmol/L NaCl、20 mmol/L KCl；II组含0.5 mmol/L Ouabain。III组为对照。在37℃水浴中预保温5 min，加底物ATP（0.5 mmol/L），于37℃水浴中反应5 min，加50 μL 15%三氯乙酸终止反应。按冯北元（1981）方法进行染色，在Beckman DU-600分光光度计625 nm处测定OD值，求出反应中生成无机磷的量，以计算ATPase的活力。

1.2.4 杀虫剂对Na-K-ATPase的抑制作用：杀虫剂用乙醇配成一定浓度的母液，用无离子水稀释至所需浓度（现配现用），在反应体系中乙醇最后浓度不应超过0.2%，与酶液在37℃下预保温5 min.，再加ATP，ATPase活力测定方法同上。以不加农药的酒精水溶液为对照。

1.2.5 蛋白质含量测定：按Bradford法进行[7]。

2 结果与分析

2.1 生物测定

三个家蝇品系对氯菊酯及溴氰菊酯的 LD_{50} 值和抗性倍数见表1。结果表明，Del-R和2Cl-R家蝇品系对溴氰菊酯和氯菊酯的抗性倍数分别为100 280.00倍和11 262.50倍，Del-R品系对氯菊酯、2Cl-R品系对溴氰菊酯存在着明显的交互抗性。

2.2 Na-K-ATPase活力测定条件的研究

以敏感家蝇品系神经系统突触体为材料，研究了pH、温度和底物浓度对ATPase活力的影响。

表 1　不同家蝇品系对二种杀虫剂的 LD_{50} 和抗性比

Table 1　Toxicity of two insecticides to three strains of housefly and resistance ratio

品系 Strain	溴氰菊酯 Deltamethrin		氯菊酯 Permethrin	
	LD_{50}^{*}（95%置信限）	RR**	LD_{50}^{*}（95%置信限）	RR**
SP	2.14×10^{4}（$1.17\sim3.51\times10^{4}$）	—	8.00×10^{4}（$0.28\sim1.50\times10^{3}$）	—
Del-R	21.4（12.42～58.60）	100 280.00	6.17（4.84～7.86）	7 712.50
2Cl-R	0.29（0.09～0.81）	1 400.00	9.01（6.92～11.28）	11 262.50

* μg/蝇；**抗性品系 LD_{50}/敏感品系 LD_{50}

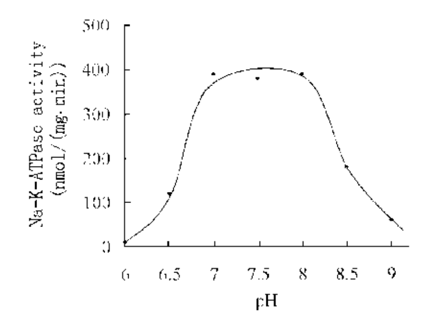


图 1　pH 对 Na-K-ATPase 活性的影响

Fig.1　Effect of pH on Na-K-ATPase activity

2.2.1　pH 对 Na-K-ATPase 活力的影响：在 37℃ 时，测定了不同 pH 值条件下 Na-K-ATPase 活力（图 1），结果表明：pH 值对该酶活力影响较大，pH 值<6.5 或>8.5，酶活力显著下降。Na-K-ATPase 反应的适宜 pH 值在 7.0～8.0。

2.2.2　温度对 Na-K-ATPase 活力的影响：在反应体系的 pH 值为 7.4 时，测定了不同温度条件下 Na-K-ATPase 的活力（图 2），图中表明，在 20～40℃ 酶活力随反应温度的升高而增加，超过 40℃，酶活力下降。故反应温度控制在 35～40℃ 为宜。

2.2.3　底物浓度对 Na-K-ATPase 活力的影响：在温度为 37℃，pH 值为 7.4 的条件下，测定了不同浓度的底物对酶

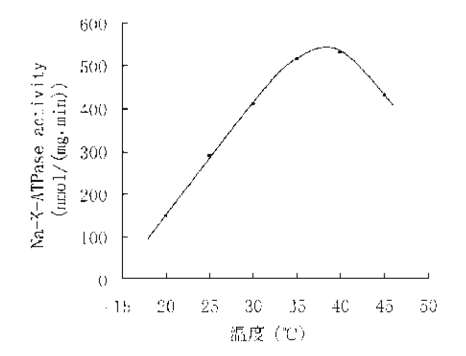


图 2　温度对 Na-K-ATPase 活性的影响

Fig.2　Effect of temperature on Na-K-ATPase activity

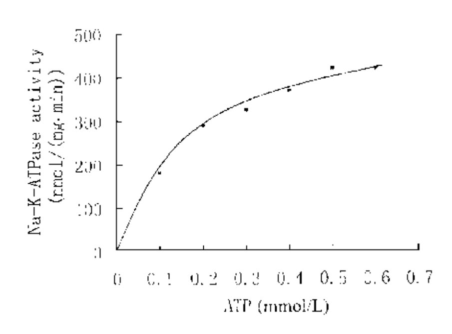


图 3　ATP 浓度对 Na-K-ATPase 活力的影响

Fig.3　Effect of ATP concentration on Na-K-ATPase activity

活力的影响作用（图 3）。ATP 浓度较低时，随着浓度的增加，Na-K-ATPase 活性呈线性关系上升，当 ATP 浓度达到一定值时，酶活性增长缓慢，曲线呈平稳状态。以 Lineweaver-Burk 曲线作图，求出 Na-K-ATPase 的 K_m 为 0.22 mmol/L，V_{max} 为 555.56 nmol/(mg·min)。故此，底物浓度应大于 0.44 mmol/L，但也不宜过高。因在 ATP 过量时，会抑制该酶的活性[2]，经测定反应体系中最佳 ATP 浓度在 0.5mmol/L 为宜。

2.3 不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性及杀虫剂对 ATPase 活力的抑制作用

在 pH 值为 7.4，温度为 37℃条件下，测定了三个品系家蝇 Na-K-ATPase 的活性及溴氰菊酯和氯菊酯对 ATPase 活力的抑制作用。见表 2、表 3。

表 2 不同家蝇品系 Na-K-ATPase 的活性

Table 2 Na-K-ATPase activity in three strains of housefly

品系 Strain	Na-K-ATPase 活力 （nmol/（mg·min））	R/S
SP	412.82（±6.82）	1
Del-R	442.63（±44.26）	1.07
2Cl-R	442.16（±29.77）	1.07

注：5～8 次重复的平均值，表 3 同此

表 3 拟除虫菊酯对不同家蝇品系 Na-K-ATPase 活性的抑制

Table 3 Inhibition of pyrethroid on nerve Na-K-ATPase in three strains of housefly

品系 Strain	抑制率（%）	
	溴氰菊酯 Deltamethrin	氯菊酯 Permethrin
SP	14.73（±4.35）	17.83（±3.72）
Del-R	3.13（±0.98）	−5.01（±1.52）
2Cl-R	−1.74（±0.72）	0.49（±1.63）

结果表明，敏感和两种不同抗性家蝇品系之间 Na-K-ATPase 活性无明显差异。在相同浓度下（10^{-4} mol/L），溴氰菊酯、氯菊酯对 SP 品系 Na-K-ATPase 抑制率分别为 14.73% 和 17.83%，而对 2Cl-R、Del-R 品系抑制率很低，甚至不抑制，且氯菊酯对 Del-R 品系的 Na-K-ATPase 存有一定的刺激作用。由此表明，抗性家蝇品系 Na-K-ATPase 对杀虫剂的敏感性已明显降低。

3 讨论

正常情况下，神经细胞膜内外 Na^+、K^+ 分布差异很大，细胞内呈高 K^+ 低 Na^+，膜外为高 Na^+ 低 K^+。这是保证神经冲动传导的必要条件之一 。Na-K-ATPase 可水解 ATP 的高能磷酸键以释放出自由能，逆着离子浓度差，主动把膜内的 Na^+ 转移到膜外，把膜外的 K^+ 移入膜内，以保持膜两侧 Na^+、K^+ 的浓度差，确保正常的神经冲动的传导[8]。当 Na-K-ATPase 活性被抑制后，使 Na^+ 不能泵出，造成神经膜处于持续兴奋状态，继而导致神经系统功能紊乱，最终使昆虫死亡。宁黔冀[4]测定了拟除虫菊酯不同异构体对美洲大蠊中枢神经系统 Na-K-ATPase 活力的影响，结果表明：10^{-4}mol/L 氯氰菊酯顺、反式异构体对 Na-K-ATPase 活力的抑制率达 58.8% 及 55.1%，高效体为 27.1%。Leng 报道[9]，溴氰菊酯在 10^{-7}mol/L 与 10^{-3} mol/L 之间可抑制家蝇脑突触体 Na-K-ATPase 与 Mg-ATPase 的活力。我们的实验结果（10^{-4} mol/L 溴氰菊酯、氯菊酯对敏感家蝇神经系统的 Na-K-ATPase 活性有明显的抑制作用）与之相符。从而说明，神经系统中的 Na-K-ATPase 可能是拟除虫菊酯类杀虫剂的重要靶标之一。

昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性机理主要包括：昆虫表皮对杀虫剂穿透速率的降低、

解毒代谢的增强以及靶标部位敏感性的降低[10,11]。Farnham[12,13]、Plapp[14]、Chang[15]等认为家蝇对拟除虫菊酯的主要抗性机制是击倒抗性（kdr），并证明它们位于家蝇第三染色体上，是一个隐性基因。冯国蕾等[16]通过毒力、抗击倒效应、杂交等试验，证明 Del-R、2Cl-R 品系也存在 kdr 抗性机制。kdr 抗性的确切机制目前还不太清楚，Miller 和 Osborne 报道[17,18]，kdr 与拟除虫菊酯对神经敏感性降低有关。赵文柱[19]用电生理的方法，测定了本室 Del-R 品系家蝇中枢神经系统对溴氰菊酯、二氯苯醚菊酯的敏感性分别下降了1 010倍和1 833倍。但是引起神经敏感性降低的分子机制知道的甚少，而目前对此的研究也主要集中于三个方面：（1）神经膜磷酯双分子层的变异；（2）钠离子通道数量的变化；（3）钠离子通道的质变[20]。李宏报道[1]，Na-K-ATPase 不仅可水解 ATP、主动运输 Na^+、K^+，而且在无 ATP 供给能量时，还具有 Na^+、K^+ 等离子通道的功能。由此可见，Na^+ 通道与 Na-K-ATPase 密切相关。张宗炳、宁黔冀等报道[21,4]，昆虫神经系统的 Na-K-ATPase 是拟除虫菊酯类杀虫剂的靶标位点之一。本文研究结果表明：三个家蝇品系的 Na-K-ATPase 活性无明显差异，依照唐振华[22]的观点，说明抗拟除虫菊酯品系家蝇神经系统中 Na^+通道数量没有减少。但拟除虫菊酯对不同品系家蝇 Na-K-ATPase 的抑制作用存在着较大的差别，药剂能抑制敏感品系家蝇 Na-K-ATPase 的活性，而对抗性品系无抑制作用，说明在抗性品系中，Na-K-ATPase 对拟除虫菊酯的敏感性有很大的降低，这也可能是 kdr 抗性的机制之一。在拟除虫菊酯抗性家蝇中 Na-K-ATPase 对杀虫剂的敏感性降低，是否是 Na-K-ATPase 的结构发生了变异，还有待进一步研究。

参　考　文　献（References）

1　李　宏．ATPase 的研究进展．生物学杂志，1996，(3)：9～12

2　祁　鸣．Na-K-ATPase 的特性研究及其应用．生物化学与生物物理进展，1986，(3)：22～26

3　Skou J C. The Na-K-ATPase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes，1992，24 (3)：249～261

4　宁黔冀，尚稚珍．昆虫 ATPase 活性的测定与应用．中国有害生物综合治理论文集，北京：中国农业科技出版社，1996，1 068～1 071

5　冯北元．大鼠脑突触体 Na-K-ATPase 活力的微量测定方法．生物化学与生物物理进展，1981，(2)：48～49

6　Feng G L，Jacques R M，Clark J M. Suppression of pyrethroid-dependent neurotransmitter release from synaptosomes of knockdown-resistant house flies under pulsed-depolarization condition during continuous perfusion. Pestic. Biochem. Physiol.，1992，42 (1)：64～77

7　Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.，1976，72：248～254

8　王伯扬．神经电生理学．北京：高等教育出版社，1982

9　Leng X F. Effect of deltamethrin on protein phosphorylation of houesfly brain synaptosome. Pestic. Sci.，1995，44：88～89

10　翟启慧．昆虫分子生物学的一些进展：杀虫剂抗性的分子基础．昆虫学报，1995，38 (4)：493～501

11　孙耘芹，袁家蝓，李　晶．家蝇对拟除虫菊酯农药的抗性机制．昆虫学报，1990，33 (3)：265～272

12　Farnham A W. Genetics of resistance of pyrethroid-selected houseflies (*Musca domestica* L.). Pestic. Sci.，1973，4 (4)：513～520

13　Farnham A W. Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroid. I. knockdown resistance. Pestic. Sci.，1977，8 (5)：631～636

14　Plapp F W，Browning C R，Peter J H. Analysis of rate development of insecticide resistance based on simulation of a genetic

model. Environ. Entomol., 1979, 8 (3): 494～499
15 Chang C P, Plapp F W. DDT and pyrethroids: receptor binding in relation to knockdown resistance (kdr) in the housefly. Pestic. Biochem. Physiol., 1983, 20: 86～91
16 冯国蕾，何凤琴，李 梅等．神经递质释放与家蝇对拟除虫菊酯抗性关系研究．昆虫学报，1997，40 (1)：15～22
17 Miller T A, Kennedy J, Collins C. CNS insensitivity to pyrethroid in the resistant kdr strain of houseflies. Pestic. Biochem. Physiol., 1979, 12: 224
18 Osborne M P, Hart R J. Neurophysiological studies of the effects of permethrin upon pyrethroid resistant (kdr) and susceptible strains of dipteran larvae. Pestic. Sci., 1979, 10: 407～413
19 赵文柱，冯国蕾，赵 勇等．家蝇对DDT和拟除虫菊酯的重要抗性机制——中枢神经系统的不敏感性．昆虫学报，1992，35 (4)：393～398
20 Lund A E. Pyrethroid modification of the sodium channel: current conception. Pestic. Biochem. Physiol., 1984, 22: 161～168
21 张宗炳．昆虫毒理学的新进展．北京：北京大学出版社，1982，7～8
22 唐振华．昆虫抗药性及其治理．北京：农业出版社，1993，332

INHIBITION OF PYRETHROID INSECTICIDES ON NERVE NA-K-ATPASE IN HOUSE FLIES (*MUSCA DOMESTICA*)

He Yunzhuan Li Mei Feng Guolei Wang Yinchang
(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The properties of Na-K-ATPase in the nerve system of house flies were described. For Na-K-ATPase the optimum pH and temperature were 7.0～8.0 and 35～40℃ respectively, the K_m value was 0.22 mmol/L ATP and V_{max} was approximately 555.56 nmol Pi/ (mg·protein·min). The Na-K-ATPase activities in susceptible (SP) and Del-R、2Cl-R house fly strains were determined. The results indicated that there was no significant difference in Na-K-ATPase activities among the three strains. Inhibition of deltamethrin and permethrin on Na-K-ATPase activity was also studied. The results showed that the two pyrethroids inhibited obviously the Na-K-ATPase activity in the susceptible strain, but no effect in the resistant strain.

Key words Na-K-ATPase, house fly, pyrethroid